

L1 ANSWER 1 OF 1 WPINDEX (C) 2002 THOMSON DERWENT  
ACCESSION NUMBER: 1983-786657 [41] WPINDEX  
DOC. NO. CPI: C1983-098779  
TITLE: Protein gel prodn. - by addn. of trans-glutaminase to  
protein soln. to effect crosslinking.  
DERWENT CLASS: D13  
PATENT ASSIGNEE(S): (AJIN) AJINOMOTO KK  
COUNTRY COUNT: 1  
PATENT INFORMATION:

PATENT NO	KIND	DATE	WEEK	LA	PG	MAIN	IPC
JP 58149645	A	19830906	(198341)*		7		<--
JP 01050382	B	19891030	(198947)				

APPLICATION DETAILS:

PATENT NO	KIND	APPLICATION	DATE
JP 58149645	A	JP 1982-31978	19820301

PRIORITY APPLN. INFO: JP 1982-31978 19820301  
INT. PATENT CLASSIF.: A23J003-00; A23L001-04

BASIC ABSTRACT:

JP 58149645 A UPAB: 19930925

In the prodn. of protein gel, at least 1 unit of (1) transglutaminase per 1 g of protein is added to (2) protein soln. contg. at least 2 wt.% of protein.

Crosslinking is effected by (1) between glutamine radicals and lysine radicals resulting in gelation of (2). The protein may be plant protein, e.g. soybean protein, or animal protein e.g. milk protein, gelatin, collagen, etc. Protein concn. of (2) is pref. 5-15 wt.%. Starch, sugar, spices, etc. may be present in (2) so long as they do not hinder gelation by (1). (1) is prep'd. from a marmot liver.

Protein from a variety of sources can be gelled into food, etc.

0/0

FILE SEGMENT: CPI

FIELD AVAILABILITY: AB

MANUAL CODES: CPI: D03-F06

## ⑪ 公開特許公報 (A)

昭58-149645

⑤Int. Cl.<sup>3</sup>  
A 23 J 3/00識別記号  
厅内整理番号  
7915-4B⑪公開 昭和58年(1983)9月6日  
発明の数 1  
審査請求 未請求

(全 7 頁)

## ④ゲル化物の製造法

②特 願 昭57-31978

②出 願 昭57(1982)3月1日

②発明者 本木正雄

横浜市金沢区釜利谷町1915-59

②発明者 丹尾式希

川崎市川崎区観音2-20-8

②発明者 滝波弘一  
横浜市港北区篠原台町3-16-

310

②出願人 味の素株式会社

東京都中央区京橋1丁目5番8

号

## 明細書

## 1 発明の名称 ゲル化物の製造法

## 2 特許請求の範囲

蛋白質濃度 2 重量% 以上の蛋白含有溶液に、  
トランスグルタミナーゼを蛋白 1 % に対して 1  
ユニット以上、添加してゲル化させることを特  
徴とするゲル化物の製造法。

## 3 発明の詳細な説明

本発明は新規なゲル化物の製造法に関する。  
既存蛋白資源の中には、生物価が低い、機能  
特性が乏しい等の理由から利用が制限されてい  
るものが多い。これらの蛋白資源を意図的に組  
織化食品に適するような機能性、栄養性を有す  
る蛋白素材に改質する技術が確立されるなら、  
その利用度が増加するだけでなく、高品質の蛋白  
食品を作りうる。改質技術の一つとして酵素  
修飾による改質があるが、現状では加水分解酵  
素による改質が主なものであり、他の酵素の利  
用例は少ない。

本発明者らはアシル転移酵素の一つであるト  
ラスグルタミナーゼに着目し、食品蛋白中に含量  
の多いグルタミン (Gln と略す) 残基とリシン  
(Lys と略す) 残基間に架橋を形成させ、ゲル状  
物質を製造できることを発見し、本発明を完成し  
た。

即ち、本発明は蛋白質濃度 2 重量% 以上の蛋白  
含有溶液に、トランスグルタミナーゼを蛋白 1 %  
に対して 1 ユニット以上、添加してゲル化させ  
ることを特徴とするゲル化物の製造法である。

本発明に用いられる蛋白質は、その起源に制約  
されるものではなく植物性蛋白質、動物性蛋白質  
などいかなるものでも使用できる。植物性蛋白質  
としては油糧種子の脱脂物 (脱脂大豆) 及びそれ  
らより分離した蛋白質を挙げることができる。ま  
た、動物性蛋白質としては乳蛋白質、ゼラチン、  
コラーゲン等を例示することができる。

これらの蛋白質の 2 重量% 以上の蛋白含有溶液  
を調製する。蛋白含有溶液の濃度は比較的高いこ  
とが望ましく通常 2 重量% 以上、好ましくは 5 重

量がないし 1.5 重量% であればよい。この場合、澱粉、多糖類、調味料、着色料、香辛料などの食品添加物を配合することができる。これらの使用量は、後のトランスクルタミナーゼによるゲル化を阻害しない範囲で適宜選択して添加すればよい。蛋白溶液の濃度が 2 重量% より少ない場合には、溶液状態のまま、もしくは沈殿を生じゲル化しない。また、蛋白含有溶液の pH は 6 ないし 9 であれば好ましい。

この蛋白含有溶液にトランスクルタミナーゼを蛋白 1 テーラーに対して 1 ユニット以上添加してゲル化させる。このトランスクルタミナーゼは Connellan らの方法 ( *Journal of Biological Chemistry*, 246 (4), 1093 (1971) ) に従つて、モルモットの肝臓より調製される。即ち、モルモットの肝臓をショ糖溶液に分散させたものを遠心分離し、上清液を回収し、これにジエチルアミノエチルセルロースカラムにて分画することによって、粗製トランスクルコシダーゼを得る。これを 1% 硫酸プロタミンで沈殿させ、沈殿物を

0.01 M となるよう ~~酢酸ナトリウムを加え、酢酸にて pH 5.0 に調整し、遠心分離する。得られた沈殿に 0.05 M リン酸緩衝液 ( pH 6.5 ) 3.0 ml 添加しホモゲナイズする。この懸濁液を遠心分離し、その上清を 0.001 M リン酸緩衝液 ( pH 7.5 ) に対して透析し、これを粗トランスクルタミナーゼ溶液として用いる方法である。~~

これらの方法は、操作順序を変化させたり、添加量、濃度、pH 範分離装置などを若干変えても差しつかえない。このようにして得たトランスクルタミナーゼの蛋白濃度をロウリー法 ( *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265 (1951) ) で、酵素活性を N-カルボベンゾキシーレーグルタミニルグリシンとヒドロキシアミンを用いたヒドロキサム酸法 ( *Journal of Biological Chemistry*, 241 (23), 5618 (1966) ) で測定すれば、調製した酵素溶液の比活性は 6.0 ないし 13.0 の範囲の値を示す。また、電気泳動によつて分子量を測定すると 8.0 万

回収する。さらにこの沈殿物を 0.2 M Tris-酢酸緩衝液で洗浄後、0.05 M 硫安-5 mM Tris-HCl 緩衝液 ( 2 mM エチレンジアミン 4 酢酸 ( 以下 EDTA と略す ) を含む ) を用いて抽出し、得られた抽出液をカルボキシメチルセルロースカラムでプロタミンを除去し、口液に硫酸アンモニウム溶液 ( 1 M EDTA を含む ) を添加し遠心分離を行ない、沈殿物を回収する。沈殿物を 1.0 mM Tris-酢酸緩衝液 ( 1 mM EDTA, 0.1 M KCl を含む ) で溶解し、遠心分離した上清液を 1.0% アガロース ( Bio Gel A-0.5 M ) でゲル通過し、得られた高活性画分を限外濃過で濃縮し、精製されたトランスクルタミナーゼを得る。

他のトランスクルタミナーゼの調製法としては、Clarke らの方法 ( *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 79, 338 (1959) ) がある。即ち、モルモット肝 300 g に、0.25 M ショ糖溶液 600 ml を加え、ホモゲナイズする。これを遠心分離し、上清を得る。

ないし 8.0 万の範囲の値である。このトランスクルタミナーゼ溶液は -30°C 程度の低温にて保存し、適時解凍して使用することができる。

このようにして得られるトランスクルタミナーゼを蛋白 1 テーラーに対して 1 ユニット以上、添加してゲル化させる。添加量が 1 ユニットより少ない場合には、高粘性の溶液となる。また、2000 ユニットより多く添加しても効果はそれほど変わらない。

トランスクルタミナーゼで蛋白分子に Glu-Lys 架橋が生じることは知られている ( J. E. Folk and J. S. Finlayson " *Advances in Protein Chemistry*, Vol. 31 ed. by C. B. Anfinsen, J. T. Edsall and F. M. Richards, Academic Press Inc., New York, N. Y., 1977, p. 1. ) が、高い蛋白溶液にトランスクルタミナーゼを作用させた時に生成されるゲルが Glu-Lys 架橋によるものである事は、以下の実験データから推察された。

① トランスクルタミナーゼの反応部位となる

lys 残基をアセチル化及びサクシニル化した αs1 カゼインにトランスクルタミナーゼを作用させてもゲル化しなかつた。

② 反応溶液中に、 S-S 遺伝子であるジチオスレイトールを共存させて反応を行なわせているので、 S-S 結合を主体とするゲルではない。

③ 加熱・冷却して得られる通常のゼラチングルとトランスクルタミナーゼでゲル化させたゼラチングルの各々の弾性率を測定したところ、通常のゼラチングルは温度が高くなるにつれ、著しく弾性率が低下した。これはゲルの網目構造をつくる架橋が共有結合などのような強い結合でなく、二次的結合であるため、温度上昇とともにこの弱い結合が切れるためであると考えられる。これに比してトランスクルタミナーゼによるゲルは温度が変化しても、その変化量は少なく、共有結合性の強いゲルである事が示唆された。事実両方のゲルを 40°C 以上にさらすとトランスクルタミナーゼ

によるゲルは、そのままであるが通常のゼラチングルは溶融した。

以上より、 Glu-Lys 架橋によつてゲルが生成されており、 S-S の架橋によるゲルではないと考えられる。

このようにして得られたゲル化物は、比較的短時間、即ち、1分以内、長くとも30分以内にてゲル化し、しかも一般のゲル化物と同等のゲル物性を備えたものである。

また、本発明で用いる蛋白含有溶液は単に蛋白質と水との混合物に限らず、蛋白質、水及び油脂を混合したエマルジョンであつてもよい。

更にこのゲル化物は加熱することにより、強度のより強いゲルを作ることができること。

本発明のゲル化物は、従来のゲル状食品と同様にヨーグルト、ゼリーなどとして用いることはもちろん、未加熱で製造でき、熱に安定なゲルであるため、マイクロカプセルの素材、固定化酵素の素材などとしても用いることができるものである。

#### 実施例 1

以下の方法によりトランスクルタミナーゼを調製した。モルモット肝 800g に冷 0.25M シリカ溶液約 2L 加え、20000 rpm、2 分でホモゲイズし、遠心分離 (105,000 × g、5°C、1 時間) を行ない上清を得た。

これを 5mM のトリス・塩酸緩衝液 (2mM EDTA 含有、pH 7.6) で平衡化してある DEAE セルロールカラムに添加。吸着させた後、上記緩衝液の食塩濃度を 0M から 1.0M まで変化させる勾配溶離法で分画し、酵素活性の高い画分を得た。

これをゆっくりと攪拌しながら 1M 硫酸プロタミン 4.0 ml を添加し、遠心分離 (14,600 × g、15 分、5°C) で沈殿を集め、これを 0.2M トリス・酢酸緩衝液 (pH 6.0) に懸濁、ホモゲイズして洗い、遠心分離 (2,500 × g、1 分、5°C) で、沈殿を集めめた。

この沈殿より、0.05M 硫安を含む 5mM トリス・塩酸緩衝液 (2mM EDTA 含有、pH 7.6)

を添加し、ホモゲイズすることによつて、トランスクルタミナーゼを抽出した。これを 3 度繰り返し、集めた抽出液を 5mM トリス・コハク酸緩衝液 (2mM EDTA 含有、pH 6.0) で平衡化したカルボキシメチル・セルロースカラムに添加し、プロタミンを除去し、溶液に 1M EDTA (pH 8.0) 2.4 ml と硫安 4.74 g を加え、よく攪拌した後に、遠心分離 (15,000 × g、10 分、5°C) で沈殿を集めた。

これを 10mM トリス・酢酸緩衝液 (1mM EDTA 0.16M KCl 含有、pH 6.0) に溶解し、遠心分離 (27,000 × g、30 分、5°C) で難溶物を除いた後、上清を同じ緩衝液で平衡化している 1.0M アガロース (Bio Gel A-0.5M) でゲル通過を行ない、活性の高い画分を集め、これを 1.0 ～ 2.0 mg/ml の濃度となるよう膜外通過 (UM-10、アミコン社製) で濃縮し、トランスクルタミナーゼ溶液とした。この溶液を -30°C 以下で凍結保存し、適時溶解し使用した (尚、これは常時 5°C で操作し調製した。)。

表1に示した基質蛋白にトランスクルタミナーゼを作用させ、ゲル化物を得た。

表 1

基質蛋白	調整法	ゲル化
牛乳蛋白 ① $\alpha_1$ -カゼイン	生乳を遠心分離によって脱脂し pH 4.5~4.8 に調整し、離沈カゼインを得る。これより Zittle <sup>※1</sup> の方法に従つて 6.6 M 尿素溶液に溶解し、水を加えて 4.6 M 尿素溶液とする。生じる沈殿を遠心分離で集め、希 NaOH 溶液にとかし、pH 7.2 とする。これに酢酸アンモニウム-エタノール $H_2O$ を添加し、沈殿を除いて得られる上清を pH 5.0 に調整し、生成する沈殿を希 NaOH にとかし、pH 7.5 とし、水に対して透析後、凍結乾燥し、 $\alpha_1$ -カゼインを得た。	5 重量% 溶液を 0.1 M トリス-塩酸緩衝液 (5 mM $CaCl_2$ 、20 mM ジチオスレイトール含有、pH 7.6) を用い、1 ml 調整し、これに 37 °C でトランスクルタミナーゼを蛋白 1 mg に対して 0.1 ユニット加えると、即座にゲル化した。
牛乳蛋白 ②Na-カゼイネット	サクラメント S (太陽化学㈱及び Solac (New Zealand Dairy Board 輸入元、日成共營㈱) )	①と同様にしてゲルを得た。但し、10 重量% の濃度でトランスクルタミナーゼを蛋白 1 mg に対して 0.09 ユニットを要した。

基質蛋白	調整法	ゲル化
③大豆蛋白 11S グロブリン	Thanh <sup>※2</sup> の方法に従つて低温抽出脱脂大豆フレーク (味の素㈱製) より、0.03 M トリス-塩酸緩衝液 (10 mM 2-メルカプトエタノール含有、pH 8.0) で抽出し、抽出液を pH 6.4 に調整、遠心分離によって沈殿を集め、標準緩衝液にとかし、pH 7.6 とし、遠心分離した上澄を透析後、凍結乾燥して 11S グロブリンとした。	②と同じ
④大豆蛋白 7S グロブリン	Thanh <sup>※2</sup> の方法に従つて、低温抽出脱脂大豆フレーク (味の素㈱製) より、0.03 M トリス-塩酸緩衝液 (10 mM 2-メルカプトエタノール含有、pH 8.0) で抽出し、抽出液を pH 6.4 に調整、遠心分離によって沈殿を除き、得られる上澄を pH 4.8 とし、生成する沈殿を集め、 $H_2O$ に分散して pH 7.0 とし、透析後、凍結乾燥して 7S グロブリンとした。	②と同じ
⑤分離状大豆蛋白	「アシプロン S-2」(味の素㈱製)	②と同じ

基質蛋白	調整法	ゲル化
⑥水抽出大豆蛋白	低温抽出脱脂大豆フレーク (味の素㈱製) を水に懸濁攪拌し、遠心分離後、上清を透析、凍結乾燥し、水抽出蛋白とした。	②と同じ
⑦離沈蛋白 (大豆)	低温抽出脱脂大豆フレーク (味の素㈱製) を 0.03 M トリス-塩酸緩衝液 (10 mM 2-メルカプトエタノール含有、pH 8.0) に懸濁、攪拌し、遠心分離によって上澄を得る。これを pH 4.8 に調整し、生じた沈殿を集め、上記緩衝液に溶解し、透析後、凍結乾燥して、離沈蛋白とした。	②と同じ
⑧大豆蛋白 粒子	丸大豆を水に浸漬し 3 分間煮沸後、ホモゲナイザーで粉碎し、通過 (200 mesh) し遠心分離して蛋白粒子とした (特開昭 56-68356 号の方法)	②と同じ
⑨大豆蛋白 ミセル	(特公昭 56-31095 号の方法)	②と同じ

基質蛋白	調整法	ゲル化
⑩ゼラチン	メルク社製	10 重量% 溶液となるように 0.1 M トリス-塩酸緩衝液 (5 mM $CaCl_2$ 、20 mM ジチオスレイトール含有、pH 7.6) を加え、これを 60 °C に加温しゼラチンを溶かす。すばやくトランスクルタミナーゼを蛋白 1 mg に対して 0.09 ユニットを加え、よく攪拌後、37 °C に保つと、即座にゲル化した。

※1 C. A. Zittle et al., J. Dairy Sci., 46, 1183 (1963)

※2 V. H. Thanh et al., J. Agric. Food Chem., 24 (6), 1117 (1976)

## 実施例 2

$\alpha_1$ -カゼイン、Na-カゼイネット、大豆蛋白 11S グロブリン、水抽出大豆蛋白、各々 500 mg を 0.1 M トリス-塩酸緩衝液 (5 mM  $CaCl_2$ 、20 mM ジチオスレイトール含有、pH 7.6)

表 2

蛋白	基質濃度 2.0 %	5.0 %	10.0 %
$\alpha_{s1}$ カゼイン	△	○	○
大豆蛋白 11S グロブリン	×	△	○
大豆蛋白 7S グロブリン	×	×	○

○: ゲル化

△: 弱いゲル

×: 溶液のまま

実施例 3

$\alpha_{s1}$  カゼイン、大豆蛋白 11S グロブリン及び大豆蛋白 7S グロブリンの 2, 5, 10 重量% 溶液を 0.1 M トリス・塩酸緩衝液 (5 mM  $\text{CaCl}_2$ , 20 mM ジチオスレイトール含有 pH 7.6) で 0.5 mL 作成し、37°C で各々にトランスクルタミナーゼを蛋白 1 mg に対して 0.1 ユニットの割合で加えて、ゲル化するか否を判定し、表 2 の結果を得た。

表 3

蛋白	酵素量 (ユニット)	$6 \times 10^{-4}$	$1 \times 10^{-3}$	0.01	0.05	1.0	2.0
5 重量% $\alpha_{s1}$ カゼイン	△	○	◎	◎	◎	◎	
10 重量% 11S グロブリン	×	×	○	○	○	◎	

◎: 即座にゲル化した

○: 1 時間以上にゲル化

△: ゲルするが弱いゲル

×: 溶液のまま

実施例 5

5 mM  $\text{CaCl}_2$  と 20 mM ジチオスレイトールを含んだ pH 7.0 ~ pH 9.0 のトリス・塩酸緩衝液を調整し、それを用いて、5 重量%  $\alpha_{s1}$  カゼイン溶液と 10 重量% 大豆蛋白 11S グロブリン溶液を各 0.8 mL ずつ作成し、トランスクルタミナーゼを蛋白 1 mg に対して 0.1 ユニット添加してゲル化するか否かを観察した。結果を表 4 に示す。

表 4

蛋白	pH	7.0	7.5	8.0	8.5	9.0
5 重量% $\alpha_{s1}$ カゼイン	○	○	○	◎	◎	
10 重量% 11S グロブリン	◎	◎	○	×	×	

◎: 即座にゲル化

○: ややゲル化に時間を要した

×: 溶液のまま

実施例 6

直径 9.3 mm、高さ 1.5 mm のテストピース作成容器に試料溶液 1 mL を流し込み、下記に示す様にゲル化させて円筒ゲルを作成し、これをレオログラム (東洋精機製作所製、CV-100) にて、18 から 25°C まで昇温させ、各温度の貯蔵弾性率を測定した。

## ① ゼラチン冷却ゲル

10 重量% 溶液となるように、ゼラチンに水を加え、60°C、3 分で完全にゼラチンを溶解

後、1mlをテストピース作成容器に流し込み、3℃にて20分放置し、ゲル化させ室温に戻して測定した。

#### ② ゼラチンTGase ゲル

ゼラチンに10重量%溶液となるように0.1Mトリス塩酸溶液(5 mM CaCl<sub>2</sub>、20 mM ジチオスレイトール含有、pH 7.6)を加え、60℃、3分で完全にゼラチンを溶解し、テストピース作成容器に流し込み、すばやくトランスクルタミナーゼをゼラチン1mgに対して0.1ユニットの割合で加え、室温に1時間放置しゲル化させ、測定した。

結果を図1に示す。ゼラチン冷却ゲルは温度が増加とともに貯蔵弾性率が著しく低下するが、それに比してゼラチンTGaseゲルは温度変化の影響が少なかつた。

#### 実施例7

$\alpha_1$ カゼインについては5重量%、大豆11Sグロブリンについては10重量%となるように

0.1 M トリス・塩酸緩衝液(5 mM CaCl<sub>2</sub>、20 mM ジチオスレイトール含有、pH 7.6)で1mgを調製し、これにトランスクルタミナーゼを蛋白1mgに対して0.1ユニットを加えゲルを得た。このゲルを、さらに100℃に20分間保つた後、室温まで冷却した。

ゲル化させた直後のゲルと、加熱処理したゲルについてレオメーター(不動工業㈱、NRM-2002J)で、プランジャー(5φ、ポール型)を侵入させた時の最高荷重を測定し、ゲル強度とした。結果を表5に示す。

表 5

蛋白	未 加 热	加熱処理後
5重量% $\alpha_1$ ゲル	12.0 g	25.6 g
10重量% 11Sゲル	2.8 g	37.0 g

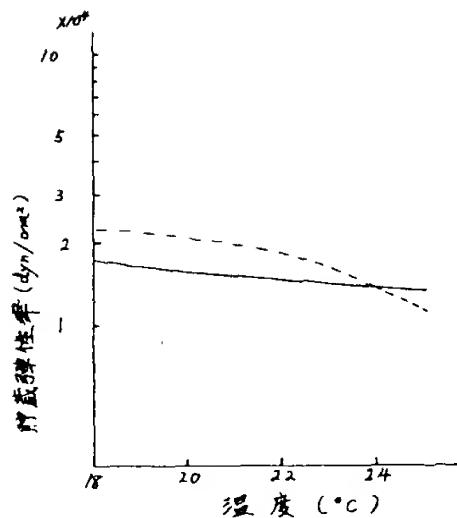
上表からわかるようにいずれの場合も加熱処理した方がゲル強度が増加した。

#### 4 図面の簡単な説明

図1は実施例6の結果を示す。図中、横軸は温度(℃)、縦軸は貯蔵弾性率(dyn/cm<sup>2</sup>)であり、実線は本発明のゼラチンTGaseゲルを、破線はゼラチン冷却ゲルを示す。

特許出願人 味の素株式会社

図1



手 続 補 正 書

特開昭58-149645(7)

(2) 明細書第9頁第7行の「5■M・トリス」を「5■M・トリス」に補正する。

(3) 明細書第10頁第14行の「Gcl」を「Gel」に補正する。

昭和57年10月6日

特許庁長官 若 杉 和 夫 殿

1. 事件の表示

昭和57年特許願31978号

2. 発明の名称

ゲル化物の製造法

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

住 所 東京都中央区京橋一丁目 5番 8号

名 称 (006) 味の素株式会社

代表者 取締役社長 歌 田 邦 弘

4. 補正命令の日付 自 発

5. 補正により増加する発明の数 なし

6. 補正の対象 明細書の発明の詳細な説明の欄

7. 補正の内容

(1) 明細書第6頁第12行の「Protecn」を「Protein」に補正する。



(4) 明細書第11頁表1の牛乳蛋白②Na-カゼイネートの欄の「化学師及び」を「化学師)及び」に補正する。

(5) 明細書第11頁表1の牛乳蛋白②Na-カゼイネートの欄の「Dacry」を「Dairy」に補正する。

(6) 明細書第11頁表1の牛乳蛋白②Na-カゼイネートの欄の「共器物)」を「共益物)」に補正する。

(7) 明細書第12頁表1の大豆蛋白11Sグロブリンの欄の「クレーク」を「フレーク」に補正する。

(8) 明細書第16頁下から第5行の「調整」を「調製」に補正する。

(9) 明細書第17頁表3欄外の「△: ゲルする」を「△: ゲル化する」に補正する。

(10) 明細書第17頁下から第7行の「CaI<sub>2</sub>」を「CaCl<sub>2</sub>」に補正する。

(11) 明細書第17頁下から第5行の「調整」を「調製」に補正する。

(12) 明細書第18頁下から第9行の「高さ1.5■」を「高さ1.5■」に補正する。